



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **60164483 A**(43) Date of publication of application: **27.08.85**

(51) Int. Cl.

C12N 9/16
/(C12N 9/16 , C12R 1:365)(21) Application number: **59020029**(22) Date of filing: **08.02.84**(71) Applicant: **MEITO SANGYO KK**(72) Inventor:
KOKUSHO SUMITAKA
KATO SHIGEAKI
MACHIDA HARUO
IWASAKI SHINJIRO**(54) PREPARATION OF PHOSPHOLIPASE D****(57) Abstract:**

PURPOSE: To btain phospholipase D useful as a reagent for research related to the metabolism of phospholipids and quantitative determination of the phospholipids in blood serum, by cultivating a micrroorganism, belonging to the genus Nocardia, and having the ability to produce the phospholipase D.

CONSTITUTION: A microorganism, belonging to the genus Nocardia, and having the ability to produce phospholipase D, preferably Nocardia sp. No.1925 (FERM- P No. 7381) is cultivated in a culture medium at 25W35°C for 1W3days preferably by the submerged spinner culture method with aeration. The aimed substance is then obtained from the resultant culture.

COPYRIGHT: (C)1985,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-164483

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月27日

C 12 N 9/16
// (C 12 N 9/16
C 12 R 1:365)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 ホスホリパーゼDの製造法

⑯ 特 願 昭59-20029

⑰ 出 願 昭59(1984)2月8日

⑱ 発 明 者 国 生 純 孝 国立市谷保7026-3
⑲ 発 明 者 加 藤 重 昭 日野市多摩平6-10-4
⑲ 発 明 者 町 田 晴 夫 日野市旭が丘2-24-4
⑲ 発 明 者 岩 崎 慎 二 郎 日野市東豊田2-21-17
⑳ 出 願 人 名糖産業株式会社 名古屋市西区笹塚町2丁目41番地
㉑ 代 理 人 弁理士 坂田 順一

明 細 書

1. 発明の名称

ホスホリパーゼDの製造法

2. 特許請求の範囲

ノカルディア属に属するホスホリパーゼD生産菌を培地に培養し、培養物からホスホリパーゼDを採取することを特徴とするホスホリパーゼDの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物によるホスホリパーゼDの製造法に関するものである。すなわち、本発明はノカルディア (Nocardia) 属に属するホスホリパーゼD生産菌を培地に培養し、培養物からホスホリパーゼDを採取することを特徴とするホスホリパーゼDの製造法である。

ホスホリパーゼD (E.C. 3.1.4.4) は、グリセロ磷脂質のリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解し、ホスファチジン酸と塩基とを遊離する酵素である。またホスホリパーゼDは、エタノール、グリセロール、エタノールアミン等のアルコ

ール基を有する化合物の共存下で、グリセロ磷脂質に作用させると、ホスファチジン酸をアルコール基へ転移することも知られている。

ホスホリパーゼDは、キャベツ、ニンジン等の植物界に広く存在することが古くより知られ、主としてキャベツの組織中より抽出して製造されている。又、最近では、微生物によるホスホリパーゼDの製造方法として、ストレプトマイセス属 (特公昭52-39918号公報)、ミクロモノスポラ属 (特開昭54-44094号公報)、ノカルディオブシス属 (特開昭58-63388号公報)、アクチノマデューラ属 (特開昭58-67183号公報) に属する放線菌を用い、発酵法により製造する方法が知られている。

ホスホリパーゼDは、磷脂質の代謝に関連する研究用試薬や血清中に含まれるリン脂質の定量用試薬等に利用される他、各種リン脂質よりのホスファチジン酸、リゾホスファチジン酸製造にも利用出来る。

本発明者等は、自然界の土壤中より広く微生物

を分離し、ホスホリパーゼDを生産する菌株を検索した。その結果、東京都八王子市の土壌より分離した菌株(ノカルディア属 NO 1925 と称する)を培地に培養すると、培地中にグリセロ磷脂質に作用してホスファチジン酸と塩基とを遊離する作用がある酵素が生成されることを確認し、本菌がホスホリパーゼDを生産することを見出した。またこの酵素は、エタノールアミン、ノ-アミノ-2-プロパノール等の適当なアルコール基を有する化合物の共存下で、グリセロ磷脂質に作用させた場合、ホスファチジン酸をアルコール基へ転移する作用を有する。

上記菌株の菌学的性状は次に示す通りである。

(a) 形態

本菌株は後記培養性状(第1表)に示す如く、殆んどの培地で白色乃至灰白色を呈する。菌叢の表面は乾いたカサカサした感じで、気菌糸の下は固い皮状の層を形成する。イーストエキス・麦芽エキス寒天培地上で27℃、5~30日間培養し観察した所見は次の通りである。

培養は25℃で行い、最も生育の旺盛な2~3週間目の各培地上における観察結果を第1表に示した。但し第1表中、生育項目に記載した基生菌糸表面の色は孢子着生前の培養一週間目における観察結果を示した。

①気菌糸：ろう状のコロニーの中心附近より白色の気菌糸を生じ全体に広がる。気菌糸の直径は0.25~0.4μと細く、分岐をもつて直線又は曲線状に伸長し、多数の断片に断断した連鎖を形成する。

②気菌糸断片：細い桿状で、大きさ0.25~0.4×0.8~1.2μ、表面は平滑。

③基生菌糸：分岐をなして伸長し、直径0.5μ、古い培養では断裂が起る。

④鞭毛孢子、孢子のう：形成せず。

⑤酸素に対する態度：好氣的に生育する。

(b) 各種培地上での性状

以下に記載する実験方法は主としてイー・ビー・シャーリング(Int. J. Syst. Bacteriol. 16巻, 313~340, 1966年)の方法にしたがつて行つた。

色調は「色の標準」(財団法人日本色彩研究所, 1964年)を用いて決定し、色相名とともに括弧内に色相名、彩度番号、明度番号の順に色相記号を記入した。

第

1

表

シュクロース・硝酸塩寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	中程度に発育 グレイーウイシユ・ホワイト(0-19) かすかに着生、ホワイト(0-20) 生産しない
グルコース・アスパラギン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	中程度に発育 イエローウイシユ・グレイ(Y-1-19) 貧弱に着生、ホワイト(0-20) 生産しない
グリセリン・アスパラギン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	貧弱に発育 イエローウイシユ・グレイ(rY-1-19) 貧弱に着生、ホワイト(0-20) 生産しない
デンプン・無機塩寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	貧弱に発育 イエローウイシユ・グレイ(Y-1-19) 貧弱に着生、グレイウイシユ・ホワイト(0-19) 生産しない

チロシン寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	中程度に発育 ベイル・イエローオレンジ(Y ₀ -2-19) 貧弱に着生、ホワイト(0-20) 生産しない
栄 養 寒 天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育 ベイル・イエローオレンジ(YO-4-19) 中程度に着生、グレイウイシユ・ホワイト(0-19) 生産しない
酵母・麦芽寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	良好に発育 ベイル・イエロー(rY-3-19) 豊富に着生、ホワイト(0-20) 生産しない
オートミール寒天	生 育 裏 面 気 菌 糸 可 溶 性 色 素	極めてよく発育 グレイーウイシユ・ホワイト(0-19) 中程度に着生、ホワイト(0-20) 生産しない

(c) 生理的性質

① 生育温度：17℃～40℃附近で生育し、25～37℃で最もよく生育する。45℃では生育しない。

② セラチンの液化：液化する（グルコース・ペプトン・セラチン培地上、25℃、3週間培養）。

③ スターチの加水分解：僅かに分解する（スターチ寒天培地上、25℃、3週間培養）。

④ 脱脂牛乳の凝固、ペプトン化：凝固せず、ペプトン化する（30℃、3～4週間培養）。

⑤ メラニン様色素の生成：ペプトンイースト鉄寒天、チロシン寒天で生成しない（25℃、2～4日間）。

⑥ グラム染色：陽性

⑦ 抗酸性菌染色：陰性

(d) 炭素源の同化性（30℃、10～16日培養）

L-アラビノース	+	シュクロース	+
D-キシロース	+	イノシトール	+
D-グルコース	+	L-ラムノース	+
D-フラクトース	+	ラフィノース	+

type) IV型、糖組成類型 (cell wall sugar pattern) A型であり、ノカルディア属に属するものであると同定された。

そこで本菌は、ノカルディア属 NO 1925 (*Nocardia* sp NO 1925) と称することにした。そして本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は「微工研菌寄第7381号 (FERM P-7381)」である。

本発明における使用菌としては、ノカルディア属 NO 1925 および本菌株を変異処理した変異株だけでなく、ノカルディア属に属しホスホリバセドを生産する菌であれば全て用いることが出来る。

本発明を実施するに当り、その培養形態としては、液体培養、固体培養いづれも用いることが出来るが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。

また使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩、及びその他の微量栄養素の他、ノカルディア属に属する

(e) 細胞の化学分析

本菌株のジアミノピメリン酸はメソ型である。細胞壁の糖組成は、キシロース、マデユロース等を有せず、アラビノース、ガラクトース、グルコース等を有する。

以上の菌学的性状を総括すると、本菌は好氣的条件下に生育し、気菌糸を着生して伸長し、多数の断片に分断した長い連鎖状気菌糸を形成し、ジアミノピメリン酸がメソ型であり、かつ細胞壁の糖組成はマデユロース、キシロースを有せず、アラビノース、ガラクトース、グルコース等を有し、基生菌糸を断裂し、鞭毛孢子や、孢子のうを形成しない。このような性状を有する本菌株について Bergey's Manual of the Determinative Bacteriology 第8版、657頁～658頁 (1974年) や、レンエバリエ (Inter. J. System. Bacteriol. 20巻、435頁～443頁、1970年)、メイヤー (Int. J. Syst. Bacteriol. 26巻、487頁～493頁、1976年) らの分類法にしたがって判定すると、本菌は細胞壁類型 (cell wall

微生物の利用することの出来る栄養源であれば、すべて使用することが出来る。

培地の炭素源としては、例えばブドウ糖、果糖、ショ糖、乳糖、澱粉、グリセリン、デキストリン、糖蜜、ソルビトール等の他、脂肪酸、油脂、粗レシチン、アルコール、有機酸などが単独でまたは組合せて用いられる。

窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源いづれでも利用可能であり、無機窒素源としては、例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、硝酸1アンモニウム、磷酸2アンモニウム、塩化アンモニウム等が挙げられ、また有機窒素源としては、大豆、米、とうもろこし、綿実、菜種、小麦などの粉、糠、脱脂粕をはじめ、コンスチープリカー、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、カゼイン、アミノ酸等が用いられる。

無機塩及び微量栄養素としては、例えばリン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、アルミニウム、カルシウム、マンガン、亜鉛等の塩類の他、ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等菌の生育やホ

スホリパーゼDの生産を促進する物であれば、必要に応じて使用出来る。

培養は好氣的条件で行なわれる。培養温度は菌が発育し、ホスホリパーゼDを生産する温度範囲で適宜変更出来るが、特に好ましいのは25~35℃である。

培養時間は条件により異なるが、ホスホリパーゼDが最高生成量に達するまで培養すればよい。液体培養の場合は通常1~3日程度である。

培養物中に生成したホスホリパーゼDは、液内培養では主として培養液中に溶けているので、培養終了液より固形物を浮別して得られる培養液よりホスホリパーゼDを採取する。

培養液中よりホスホリパーゼDを採取するに当つては、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。例えば硫酸、食塩等による塩析、アセトン、エタノール、メタノール等の有機溶剤による沈殿、透析、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲル濾過、吸着剤、等電点沈殿等の方法が使用出来る。さらにこれ等

の方法を適当に組み合わせることによつて、ホスホリパーゼDの精製効果が上る場合には、組合せて行うことが出来る。

これ等の方法により得られる酵素は、安定化剤として各種塩類、糖質、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加えるか、もしくは加えることなく減圧濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥等の方法により液状又は固形のホスホリパーゼDにすることが出来る。

ホスホリパーゼDの酵素活性測定法は、基質グリセロ磷脂質に作用してリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解して生ずる塩基の量を測定して求める。ホスホリパーゼDの活性は、特に記載しないかぎり、以下に記載するコリンオキシダーゼ法により測定した。

力価測定法：

1%卵黄精製レシチンエマルジョン(0.1%レシチン、1mlエチルエーテル、10ml蒸留水の超音波乳化液)0.1mlに、0.2M pH 8.5 トリス-塩酸緩衝液0.1ml、0.1M CaCl₂水溶液0.05ml、蒸留水0.15mlを混合し、こ

れに酵素液0.1mlを加え、37℃で20分反応後、50mM EDTA-2Naを含む1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)0.2mlを加え、直ちに5分間煮沸して反応を完全に停止する。次にコリンエステラーゼ測定用試薬〔日本商事(株)製造〕のキットに含まれるコリン呈色剤を呈色溶解液に溶解した溶液4mlを加え、37℃で20分間反応させた後、500nmの吸光度を測定する。

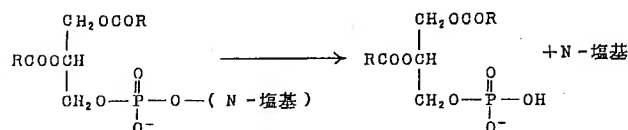
対照としては、あらかじめ熱失活した酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定する。

そして1時間に1μモルのコリンを遊離する酵素活性を1単位とする。

次に実施例2に記載した方法により精製した酵素標品を用いたホスホリパーゼDの理化学的性質について述べる。

① 作用

グリセロリン脂質のリン酸と含窒素塩基とのエステル結合を分解してホスファチジン酸と塩基を遊離する。



② 基質特異性

基質としてレシチン、リゾレシチン、スフィンゴミエリンのいずれか1つを0.5μモル含むエマルジョン0.1mlを用い、蒸留水又は留水の代わりに1% Triton X-100を含む水溶液を用い、上記力価測定法と同様にして反応させ遊離したコリン量を測定し、各基質に対するホスホリパーゼDの活性を測定した。その結果、蒸留水の場合は、レシチンに対する活性を100とした時の相対活性は、リゾレシチン350、スフィンゴミエリン0.1以下であり、1% Triton X-100の場合は、レシチンに対する活性を100とした時の相対活性は、リゾレシチン250、スフィンゴミエリン0.1以下であつた。

③ 至適 pH

力価測定法において用いる緩衝液の代りに pH 3.0~4.0 では塩酸・酢酸ソーダ緩衝液、pH 4.0~5.5 では酢酸・酢酸ソーダ緩衝液、pH 5.5~8.5 ではトリス・マレイン酸・苛性ソーダ緩衝液、pH 7.0~9.0 ではトリス・塩酸緩衝液、pH 9.0~10.0 ではグリシン・苛性ソーダ緩衝液、pH 11.0~12.0 ではリン酸2ナトリウム・苛性ソーダ緩衝液を用いてホスホリパーゼ D の活性を測定し、至適 pH を求めた。また同測定法で用いる蒸留水 0.15 ml の代りに 1% Triton X-100 (和光純薬) 水溶液 0.15 ml を用いた時の至適 pH についても求めた。

その結果は第1図に示す通りで、蒸留水を用いた場合の至適 pH は 7.0 付近であり、1% Triton X-100 水溶液を用いた場合の至適 pH は 8.5 付近に認められた。

④ 至適温度

力価測定法において、反応温度条件を 17、25、37、45、50、55、60、70、80 および 90℃ で酵素活性を測定した。その結果は

いる他は、上記と同様に操作して pH 安定範囲を調べたが、結果は第3図と殆んど変らなかつた。

⑥ 熱安定性

酵素溶液 1.0 ml に 0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) 4 ml を加え、20、30、37、45、50、55、60、65 および 70℃ に 30 分間放置した後、残存する酵素活性を測定した。その結果は第4図に示す通りで、30℃ で 30 分の熱処理では殆んど失活せず、50℃ で 30 分の熱処理で 80% の活性が失活した。

⑦ 各種物質による影響

力価測定法において CaCl₂ 水溶液の代りに各種物質の水溶液を 0.05 ml 加え、酵素反応系中で 1 mM 濃度になるようにして活性を測定した。その結果は水添加の時の活性を 100 とし、相対活性として賦活作用のあつた物は、例えば CaCl₂、SnCl₂、コール酸ソーダ、Triton X-100 等であり、一方阻害作用のあつたものとしては ZnCl₂、CdCl₂、NiCl₂、EDTA-2Na (エチレンジアミン四酢酸2ナトリウム) 等である。

第2図に示す通りであつて、至適温度は 40℃ から 45℃ の範囲であると認められる。

⑤ pH 安定性

酵素溶液 0.1 ml に 0.2 ml の 0.1 M の各種緩衝液、すなわち pH 3.0~3.5 ではグリシン・塩酸緩衝液、pH 3.5~7.0 では酢酸・酢酸ソーダ緩衝液、pH 5.0~8.0 ではトリス・マレイン酸・苛性ソーダ緩衝液、pH 7.0~9.0 ではトリス・塩酸緩衝液、pH 9.0~10.0 ではグリシン・苛性ソーダ緩衝液、pH 11.0~12.0 ではリン酸2ナトリウム・苛性ソーダ緩衝液を夫々加え、37℃ で 2 時間保つた。その後、これら酵素緩衝液に 0.5 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 8.5) 1.2 ml を加え、pH を 8.0~8.5 とした。この溶液 0.1 ml を用い、力価測定法に従つて力価を測定し、安定 pH 範囲を調べた結果、第3図に示した通り本酵素の特に安定な pH 範囲は 3.5~10.0 であると認められた。

また力価測定法で用いる蒸留水 0.15 ml の代りに 1% Triton X-100 水溶液 0.15 ml を用

⑧ 力価の測定法

前述したとおりである。

⑨ 精製方法

前述したとおりであり、その具体例は実施例2に記載のとおりである。

⑩ 等電点

2.52 ± 0.1 (アンホライン電気泳動法により測定)

⑪ 分子量

4.5 万以上 (セファロース 6 B によるゲル濾過法)

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれによつて制限されるものではない。

実施例 1

シード培地としてグリセリン 0.5%、NH₄NO₃ 0.25%、ペプトン 0.5%、K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.01%、酵母エキスを 1% を含む水溶液培地 (pH 6.8) 100 ml を 500 ml 坂口フラスコに入れ、蒸気殺菌後、ノカルディア属 NO

1925菌株の胞子を一白金耳接種し、培養温度30℃、120回転/分で2日間振盪培養してシード培養液を得た。

つぎに、本培地すなわちグリセリン1.0%、コーンステープリカー1.0%、ペプトン0.5%、粉末酵母エキス0.1%、 NH_4NO_3 0.25%、 K_2HPO_4 0.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%からなる培地(pH7.0)50mlを500ml容坂口フラスコに入れ、1.21℃で10分蒸気殺菌後、シード培養液5mlを移植し、25℃で2日間培養した。

培養後、遠心分離して固形物を除去し、培養液50ml(1.5u/ml)を得た。これに硫酸22.7%を攪拌しながら^{標ス}除去に加えてホスホリパーゼDを沈殿させた。遠心分離により沈殿を集め、0.02Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.5)に溶解してホスホリパーゼD活性を測定した。

この時の培養液に対するホスホリパーゼDの活性回収率は67%であった。

実施例 2

次にバイオエンジニアリング社製の限外膜過膜(Type G-10T)を用いて濃縮した後、セファロース(Sephrose)6B充填カラムに注入し、蒸留水を用いて通塔し、活性区分を集めて凍結乾燥した。かくして約30%の活性回収率でホスホリパーゼDを回収し、この時の比活性は6640u/mg蛋白質であった。

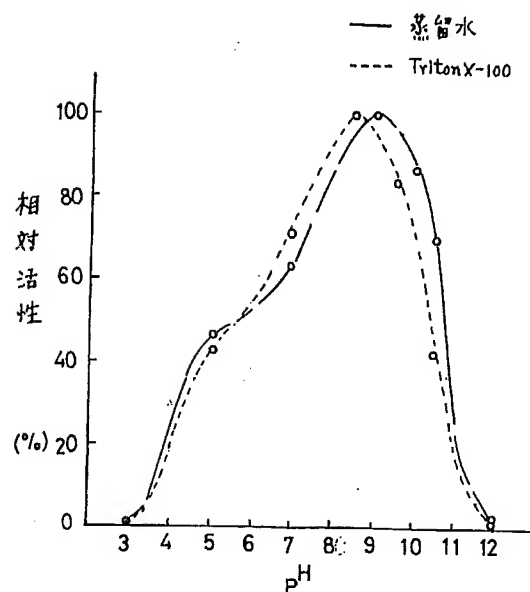
4. 図面の簡単な説明

図面は本発明方法によつて得られるホスホリパーゼDに関するもので、第1図は至適pHを示す曲線、第2図は至適温度を示す曲線、第3図はpH安定性を示す曲線、第4図は熱安定性を示す曲線である。

きな粉3.0%、コーンステープリカー1.0%、ペプトン0.5%、粉末酵母エキス0.1%、グリセリン1.0%、 NH_4NO_3 0.25%、 K_2HPO_4 0.25%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%、シリコーンKM-72 0.1%から成る培地(pH6.5)約15ℓを30ℓジャーファーマンターに入れ、120℃で15分間滅菌後、実施例1に記載したシード培養液1.5ℓを植菌し、25℃で72時間培養を行った。

培養後、菌体固形物を遠心分離により除去し、遠心上清13ℓ(10.0u/ml)を得た。この遠心上清を5℃に冷却した後、-20℃のアセトンを加えてアセトン濃度0~80%画分に相当するホスホリパーゼDを含む沈殿物を遠心分離により集めた。この沈殿物をpH6.0トリス-マレイン酸に溶解し、0.02Mの同緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したDEAE-トヨパールに通塔し活性を吸着後、食塩濃度勾配法により活性区分を溶出分離した。

図1

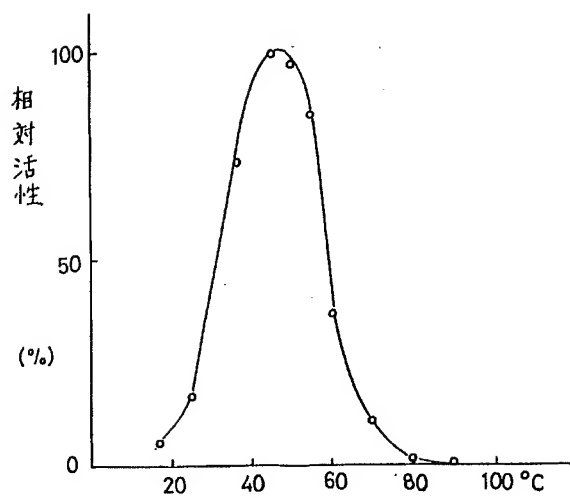


出願人 名糖産業株式会社

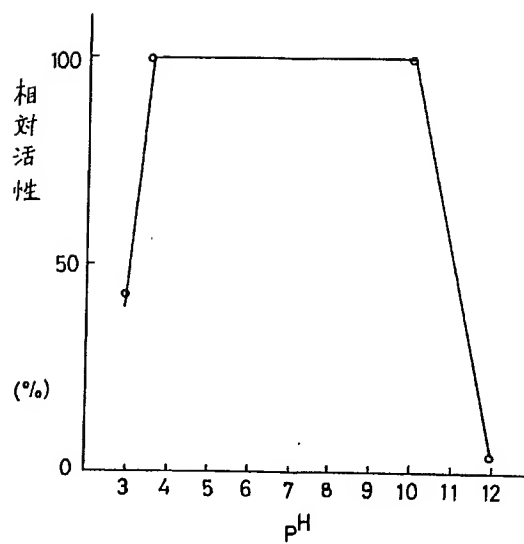
代理人 弁理士 坂田 順



才 2 図



才 3 図



才 4 図

